

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-126739

(43)公開日 平成5年(1993)5月21日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

G 0 1 N 21/64

識別記号

府内整理番号

B 9115-2 J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数2(全14頁)

(21)出願番号

特願平3-286290

(22)出願日

平成3年(1991)10月31日

(71)出願人 000236436

浜松ホニクス株式会社

静岡県浜松市市野町1126番地の1

(72)発明者 石川 満

静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホニクス株式会社内

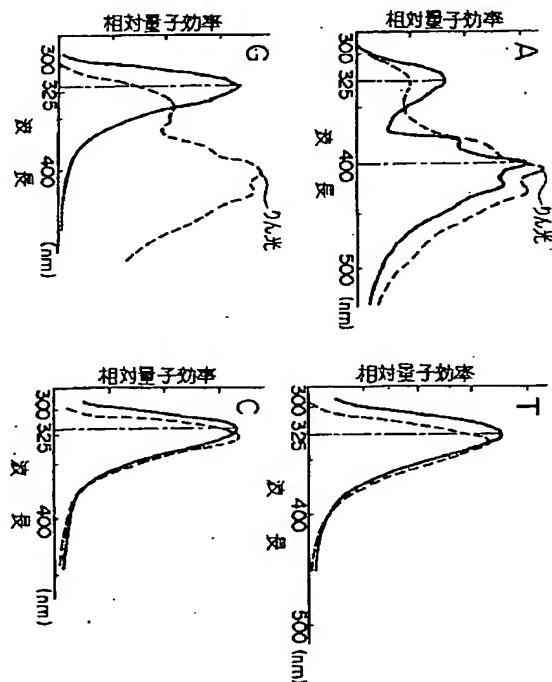
(74)代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外3名)

(54)【発明の名称】 核酸塩基識別法

(57)【要約】

【目的】 本発明は、DNAが本来持っている発色団を利用して、核酸塩基の識別を超高速で行う方法を提供する。

【構成】 本発明に係る核酸塩基識別法は、DNAをガラス質溶媒中に投入して低温化し、ガラス質溶液に蛍光増強剤を添加して紫外線を照射し、ガラス質溶媒から観測される蛍光寿命によって、DNAが有する核酸塩基を識別する。なお、前述のガラス質溶媒はアルコール、もしくはアルコールと水の混合液、もしくはアルコールとエーテル、アセトンの混合液であり、蛍光増強剤は、励起光の波長領域で吸収スペクトルを有しない強酸であることが望ましい。上記の方法を用いることにより、DNA中の核酸塩基を超高速で識別することができる。



1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】DNA塩基を、それらを溶かすことのできる極性ガラス質溶媒中に投入して低温化し、当該ガラス質溶液に蛍光増強剤を添加して紫外線レーザを照射し、ガラス質溶媒から観測される蛍光寿命によって、前記DNAが有する核酸塩基を識別することを特徴とする核酸塩基識別法。

【請求項2】前記ガラス質溶媒は、アルコール単独、もしくはアルコールと水の任意の混合比液、もしくはアルコールとエーテルあるいはケトンの任意混合比液であり、前記蛍光増強剤は、励起光の波長領域で吸収スペクトルを有しない強酸であることを特徴とする請求項1記載の核酸塩基識別法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、DNA中の核酸塩基の識別法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】図7に示されるように、遺伝子の本体であるDNA(デオキシリボ核酸)は、4種のデオキシヌクレオチド、即ちデオキシアデニル酸(同図(a)図示)、デオキシグアニル酸(同図(b)図示)、デオキシチミジル酸(同図(c)図示)そしてデオキシシチジル酸(同図(d)図示)が、図8(a)に示されるように共重合したものである。これらのデオキシヌクレオチドは、それぞれのデオキシリボースのBase部位に、核酸塩基であるアデニン(同図(b)図示)、グアニン(同図(c)図示)、チミン(同図(d)図示)、そしてシトシン(同図(e)図示)を有しているものである。このようなデオキシヌクレオチドの配列順序は遺伝子固有のものである。

【0003】従来、上記の配列順序を明らかにするため、放射性同位元素(R.I.)あるいは蛍光色素でDNA鎖をラベルするという方法がとられていた。しかしこの方法では、蛍光色素等を改めて添加するといった予備的な処理を行わなければならない。

【0004】そこで、このような予備的処理をせずに、DNAが本来持っている発色団を利用した識別法が行われている。その代表例として、水とメタノールを1:1の割合で混合した溶媒にDNAを投入した溶液を用いる方法が、下記の文献

"Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry Vol. I Academic Press(1974) p.322~p.328"

に示されている。この方法では、溶液の温度を77Kまで低下させた後に、第2高調波発生装置を用いて紫外線レーザをその試料溶液に照射する。このレーザ光によって、前述の溶液中を1分子ずつ流れてくるDNAの4種類の核酸塩基であるA(アデニン)、T(チミン)、G(グアニン)、C(シトシン)が有するそれぞれの発色団の電子が励起され、蛍光あるいはりん光を発する。こ

のように低温の下でレーザ光を励起光として照射することによって、核酸塩基の発光量子収率が室温に比べ著しく増加することが示されている。

【0005】なお、溶媒を水とメタノールの混合液としたのは、水を単独で用いると低温下において体積膨脹を伴い、容器の破壊を引き起こすからである。通常は、水にアルコール類を添加して低温下での体積の膨脹を防ぎ、しかも透明なガラス状の溶媒として用いている。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】図9は、上記の方法を用いて溶液から発せられる蛍光とりん光のスペクトルを示したものである。図示されるように、すべての核酸塩基において、波長325nm近傍に蛍光のピークが見られる。さらに、A、Gの場合には400nm近傍にピークを持つ大きな峰を持ったスペクトルが見られる。これはりん光スペクトルであり、これらのりん光寿命を測定すると、それぞれ2.7秒、1.6秒であった。このりん光寿命によってAとGを識別することができる。さらに、りん光を発しないTとCについては、蛍光寿命を測定した。図10は、4種類の核酸塩基の蛍光寿命を示したものである。同図において縦軸は蛍光強度を、横軸は蛍光寿命を示しており、横軸の1chは77psに等しい。100ch付近に示される鋭いピークは励起光を示し、なだらかな減衰曲線は核酸塩基からの蛍光を示している。りん光で識別できなかったTとCについて、それらを比較した場合、蛍光強度の減衰曲線に明らかに違いが生じていることがわかる。したがって、この蛍光寿命によって、双方を識別することができる。このようにして、A、T、G、Cの4種類の核酸塩基をりん光寿命と蛍光寿命によって区別することができる。

【0007】しかし、前述の方法によれば、りん光寿命によるA、Gの区別は可能ではあるが、超高速シークエンス(最悪でも0.1秒に1個同定できる速度)を考えた場合、それらのりん光寿命は長すぎるために、核酸塩基を区別するためのパラメータとして使うことはできない。

【0008】またりん光はTとCには発生しないため、りん光寿命による識別ができない。このため、さらに蛍光寿命によって双方を識別しなければならず、DNA中に含まれている核酸塩基の識別を効率的に超高速で行うことができないという問題があった。

【0009】ところが、図11に示されるように、蛍光寿命の比較のみでは識別が困難な場合がある。同図は、長寿命成分の蛍光寿命と成分比の関係を示したものである。これらの長寿命成分に着目した場合、Cの蛍光時間365psは成分比が77.6%であり、他の3種の核酸塩基A、T、Cと明らかに識別することができる。しかし、A、T、Cの3種を長寿命成分で識別することは困難であり、また、たとえGを識別できたとしてもAとTを識別することは困難であるという問題があった。

50

【0010】そこで本発明では、上記の問題点を解決した超高速の核酸塩基識別法を提供する。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明に係る核酸塩基識別法はDNAをガラス質溶媒中に投入して低温化し、ガラス質溶液に蛍光増強剤を添加して紫外線レーザを照射し、ガラス質溶媒から観測される蛍光寿命によって、DNAが有する核酸塩基を識別することを特徴とする。

【0012】なお前述のガラス質溶媒としては、極性分子である核酸塩基をよく溶かすアルコール、もしくはアルコールと水の混合液、もしくはアルコールとエーテルあるいはケトンとの混合液などの極性溶媒であり、蛍光増強剤は励起光の波長領域で吸収スペクトルを有しない強酸であることが望ましい。

#### 【0013】

【作用】本発明によれば、低温の下、試料溶液に蛍光増強剤を添加してりん光を抑えることによって、蛍光寿命の差を顕著なものとすることができます。

【0014】なお、前述の蛍光増強剤として励起光の波長領域で吸収スペクトルを有しない強酸を用いるため、核酸塩基中の不対電子にプロトロンが付加し、(n, π<sup>+</sup>)状態を消滅させることができる。

#### 【0015】

【実施例】ここで、本発明の実施例に係る核酸塩基識別法について具体的に説明する。まず、水とメタノールを1:1の割合で混合した溶媒にDNA塩基を投入し、77Kに降温する。この溶液に蛍光増強剤、即ち(n, π<sup>+</sup>)クエンチャーとして強酸を添加し、さらに紫外線を照射する。本実施例では、(n, π<sup>+</sup>)クエンチャーとして0.1Nの塩酸を用いた。図1は、試料溶液への紫外線照射によって発光した蛍光・りん光のスペクトルを示した図である。同図中、破線は(n, π<sup>+</sup>)クエンチャー添加前の、実線は(n, π<sup>+</sup>)クエンチャー添加後の蛍光・りん光スペクトルを示している。図示されるように0.1Nの塩酸を添加することによってGのりん光が抑えられ、また、すべての核酸塩基において、蛍光スペクトルのピーク値が増大している。

【0016】次に、0.1N塩酸の添加による試料溶液中の電子状態の変化について説明する。A、Gが中性・アルカリ性の水・アルコールの混合溶媒(77K)中にある場合、電子スピinnが反平行な一重項状態(S)と電子スピinnが平行な三重項状態(T)の(n, π<sup>+</sup>)状態のエネルギー・レベルは、それぞれの(n, π<sup>+</sup>)状態よりも高いレベルに存在する(図2(a)図示)。これに光照射を行うと、基底レベルの電子が励起されて最低励起一重項状態であるS<sub>1</sub>(n, π<sup>+</sup>)状態に遷移する。

この状態では、E1'Sayedの規則によりS

1 (π, π<sup>+</sup>)状態から最高励起三重項状態のT<sub>2</sub>(n, π<sup>+</sup>)状態への系間交差が生じやすくなる。このT<sub>2</sub>(n, π<sup>+</sup>)状態にある電子は、内部転換により最低励起三重項状態のT<sub>1</sub>(n, π<sup>+</sup>)状態に遷移し、さらに基底レベルに遷移する際にりん光を発する。ところが、(n, π<sup>+</sup>)クエンチャーとして0.1Nの塩酸を試料溶液に添加すると、溶液中に解離したH<sup>+</sup>が核酸塩基のn軌道の不対電子に付加するために、上述のS<sub>2</sub>(n, π<sup>+</sup>)状態とT<sub>2</sub>(n, π<sup>+</sup>)状態が消滅してしまう(同図(b)図示)。したがって系間交差が起こらず、りん光も発生しにくい。

【0017】なお、核酸塩基Aの場合は、発色団の不対電子にH<sup>+</sup>が結合する酸・塩基反応の平衡定数の関係で、0.1Nの塩酸を添加した試料溶液中においては、その電子状態が図2(a)と(b)に示される場合の混合状態にあると考えられる。したがってりん光の発生を完全に抑えることはできないが、蛍光スペクトルがやや増加する。

【0018】一方核酸塩基TとCの場合は、図2(c)に示されるようにS<sub>1</sub>(n, π<sup>+</sup>)状態よりもT<sub>2</sub>(n, π<sup>+</sup>)状態が高いレベルにある。したがって、T<sub>2</sub>(n, π<sup>+</sup>)状態を経由した効率の良い系間交差は起こらないのでりん光の発生も少ない。このため、

(n, π<sup>+</sup>)クエンチャーとして0.1Nの塩酸を試料溶液に添加しても、はじめからT<sub>2</sub>(n, π<sup>+</sup>)状態がS<sub>1</sub>(n, π<sup>+</sup>)状態からの系間交差に寄与していないのでりん光は発生せず、消光の必要がない。

【0019】図3は、本実施例に係る識別法を用いた4種類の核酸塩基の蛍光寿命を示したものである。同図において縦軸は蛍光強度を、横軸は蛍光寿命を示しており、横軸の1chは77psに等しい。100ch付近に示される鋭いピークは励起光を示し、なだらかな減衰曲線は核酸塩基からの蛍光を示している。これらの図からわかるように、各々の核酸塩基によって減衰曲線が異なっており、蛍光寿命に差があることが明らかである。この蛍光寿命と長寿命成分比の関係を図4に示す。図4によれば長寿命成分に着目することによって、予備処理なしに4種の核酸塩基を明らかに識別することができる。

【0020】これまで、(n, π<sup>+</sup>)クエンチャーを添加することにより可能となる4種の核酸塩基の蛍光寿命からの識別法について述べてきたが、ここで核酸塩基A、T、G、Cの蛍光・りん光吸率、及び蛍光寿命の温度依存性についての概要を説明する。一般に蛍光量子吸率φ<sub>f</sub>は、下記の式によって求められ、

【0021】

【数1】

k<sub>f</sub>

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_{ISC} (\text{あるいは} k_{ISC'}) + k_{IC} + k_{exp}(-\Delta E/RT)}$$

【0022】蛍光寿命 $\tau_f$ は下記の式によって求められる。

$$\tau_f = \frac{1}{k_f + k_{ISC} (\text{あるいは} k_{ISC'}) + k_{IC} + k_{exp} (-\Delta E / RT)}$$

【0024】上記の式において、 $k_f$ は蛍光発光の速度定数、 $k_{IC}$ は一重項での温度に依存しない内部転換の速度定数、 $k_{ISC}$ は系間交差に $T_2$ (n,  $\pi^*$ )準位が寄与する場合の速度定数、 $k_{ISC'}$ は系間交差に $T_z$ (n,  $\pi^*$ )準位が寄与しない場合の速度定数、 $k_{exp}(-\Delta E / RT)$ は一重項での温度に依存する内部転換の速度定数を示す。一般に、温度に依存する速度が $exp(-\Delta E / RT)$ 型となるのは実験事実によって広く認められており、 $\Delta E$ は活性化エネルギーを、Rは気体定数を示している。図5は、各速度定数、活性化エネルギーの値として妥当な値を適当に仮定して式1に代入して得られた結果を示したものであり、 $k_{exp}(-\Delta E / RT)$ の値の温度による変化を示したものである。同図によれば、150Kよりも高温になると蛍光量子収率 $\phi_f$ が顕著に小さくなるので150K以下で蛍光寿命 $\tau_f$ を測定するのが望ましい。さらに100K以下では、 $k_{exp}(-\Delta E / RT)$ が他の速度定数に比べて十分無視できるので、蛍光量子収率 $\phi_f$ 増強のための温度としては100K以下の任意の温度でよい。

【0025】これまで説明してきたように、核酸塩基中のA、T、G、Cの蛍光寿命は(n,  $\pi^*$ )クエンチャーを添加することによってそれぞれの差が顕著になり、特にGについては(n,  $\pi^*$ )クエンチャーの添加前後の変化が大きい。これは(n,  $\pi^*$ )クエンチャーのH<sup>+</sup>に対する核酸塩基の反応性が異なるため、りん光が消滅する際に蛍光の発生に寄与する割合にも変化が生じ、その結果、各々の蛍光寿命に差が生じたと考えられる。この影響で、各核酸塩基の吸光スペクトルも変化している(図6図示)。

【0026】なお、本実施例では(n,  $\pi^*$ )クエンチャーとして塩酸を用いたが、その効果の本質はA、T、G、Cのすべてに含まれているカルボニル基や芳香環に含まれる窒素上の非結合電子対にH<sup>+</sup>が結合する(プロトン化)ことにある。したがって、塩酸でなくても効果的に非結合電子対をプロトン化できる酸(例、塩酸、硫酸、硝酸)であれば構わない。但し、蛍光の例起光(250~290nm)の領域で吸収を持つ酸(例、トリクロロ酢酸)は適さない。また、溶媒としては、試料を十分に溶かし、低温下でも透明なガラス状になっているものを用いることが必要である。このような性質を持たない溶液は、通常低温で凍らせると、溶媒自身が微結晶を形成して白い粉末状になって光が通りにくくなる。そこ

【0023】  
【数2】

で、極性分子を試料とする場合これらの試料がよく溶ける極性溶媒として水とアルコール類(例、メタノール、エタノール、エチレングリコール、イソプロパノール)の任意の混合比の混合溶液、あるいはこれらアルコール単独の溶媒、または、これらのアルコール類とエーテル、あるいはケトンとの任意の混合溶液がよく用いられている。即ち、互いによく混じり合って、ランダムな液体構造を作り易いものを用いることが必要である。

【0027】

【発明の効果】以上説明したように、塩酸等の蛍光増強剤を溶媒に添加することによって蛍光寿命の差が顕著になる。したがってその差をもとにして観測される蛍光寿命を比較することにより、A、T、G、Cを超高速で同定することができる。さらに、励起波長の選択、蛍光寿命の測定、りん光の測定を組み合わせることによって、十分な数の分子があれば4種の核酸塩基を確実に区別できる。

【0028】なお、(n,  $\pi^*$ )状態を消滅させることによって蛍光を増強させることができ、超高速の核酸塩基識別に寄与することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の核酸塩基識別法による蛍光・りん光スペクトルを示す図である。

【図2】本発明の核酸塩基識別法による分子状態を示す図である。

【図3】本発明の核酸塩基識別法による蛍光寿命を示す図である。

【図4】本発明の核酸塩基識別法による長寿命成分の蛍光寿命と成分比を示す図である。

【図5】温度と、一重項内部変換の速度定数との関係を示す図である。

【図6】(n,  $\pi^*$ )クエンチャー添加前後における吸収スペクトルを示す図である。

【図7】DNA中のデオキシヌクレオチドの構造式である。

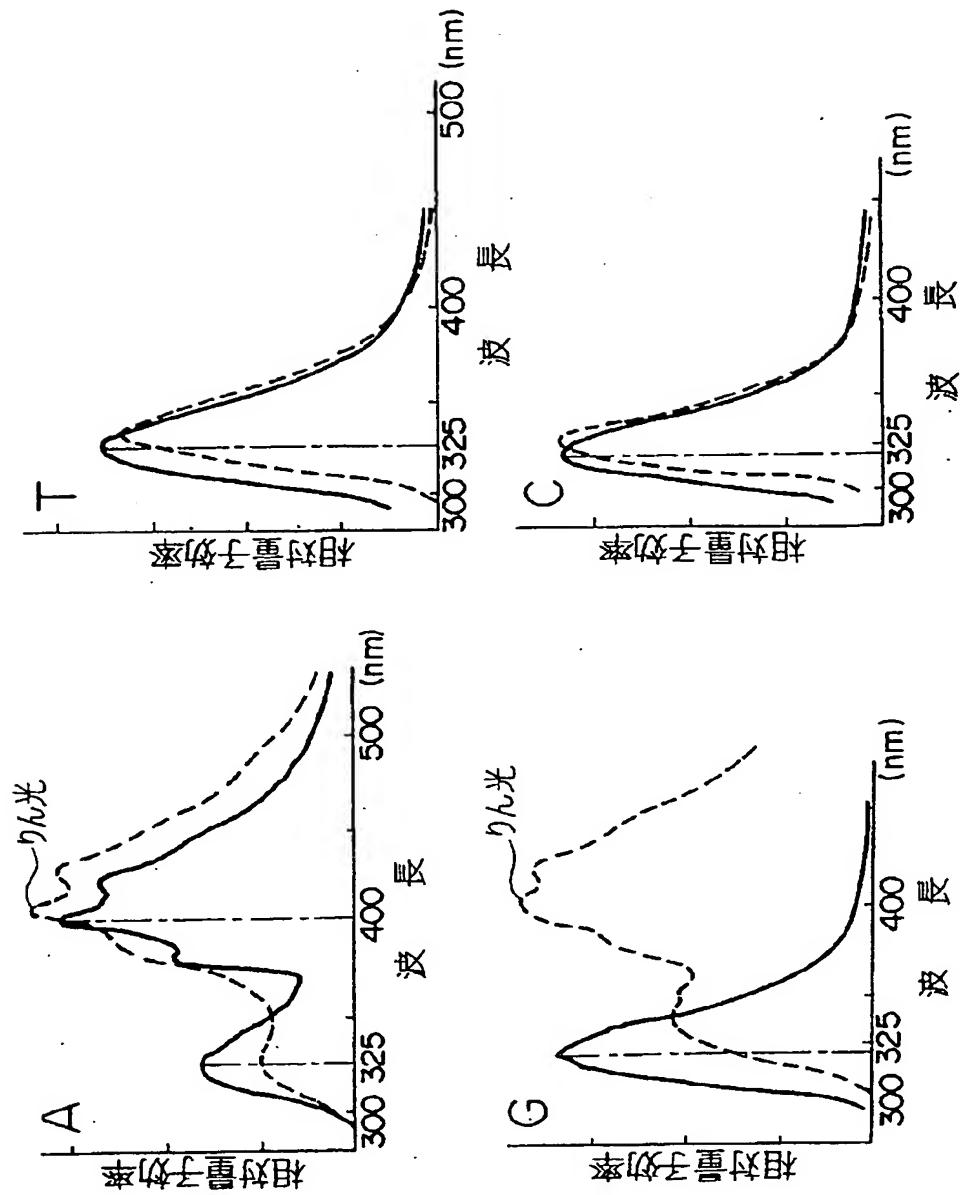
【図8】DNA及び核酸塩基の構造式である。

【図9】(n,  $\pi^*$ )クエンチャー添加前の蛍光・りん光スペクトルを示す図である。

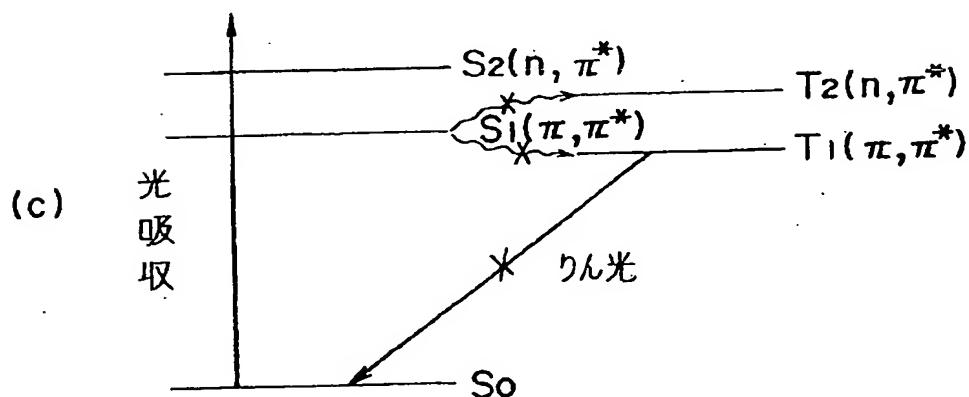
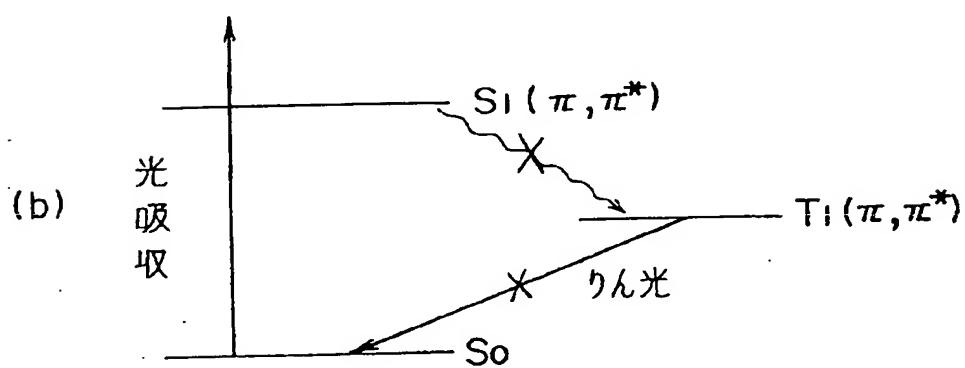
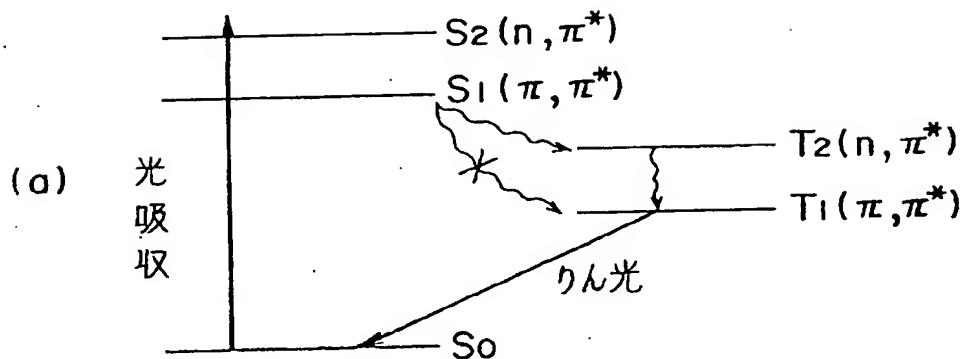
【図10】(n,  $\pi^*$ )クエンチャー添加前の蛍光寿命を示す図である。

【図11】(n,  $\pi^*$ )クエンチャー添加前の長寿命成分の蛍光寿命と成分比を示す図である。

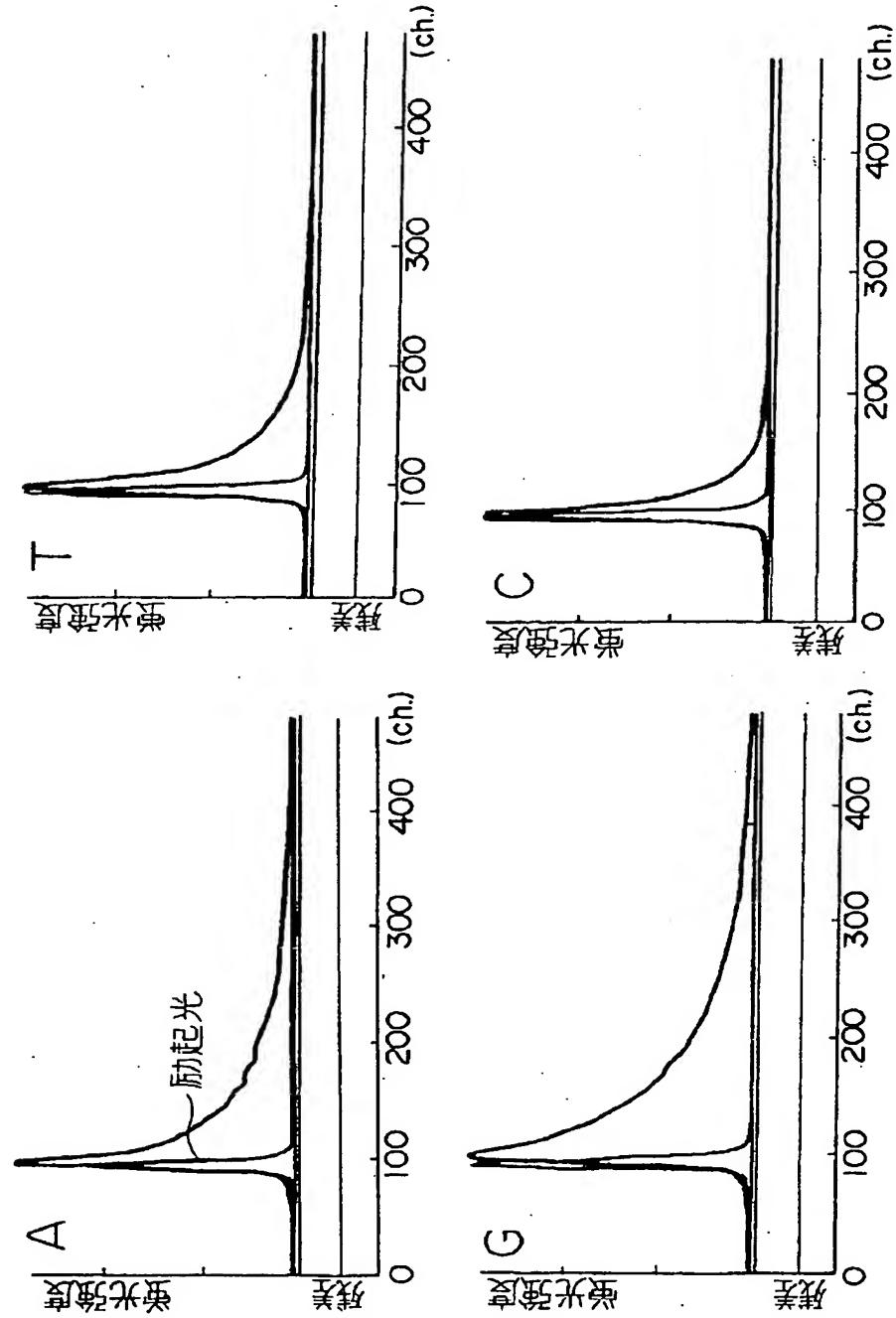
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

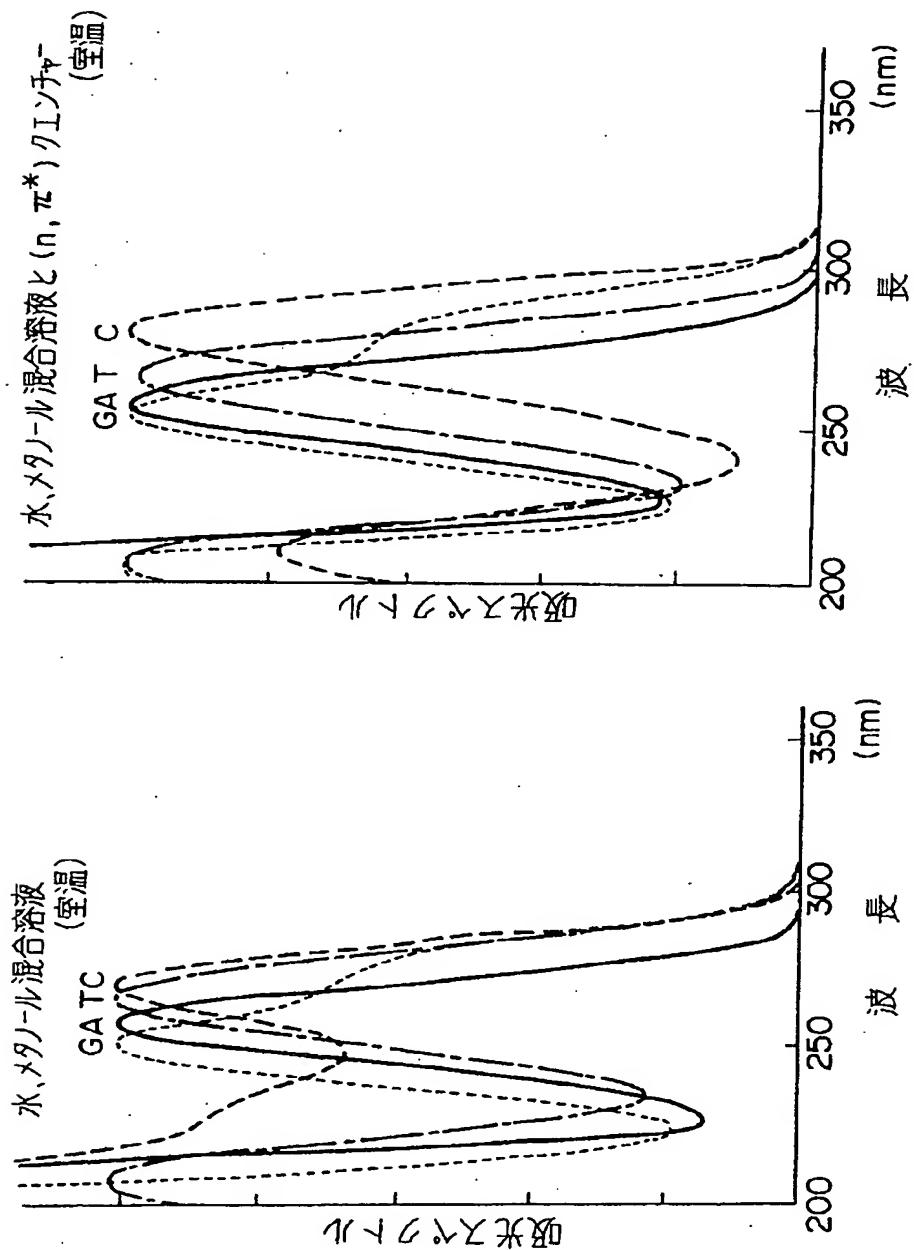
	蛍光寿命(ps.)	成分比 (%)
A	377	76.8
	$5.2 \times 10^3$	23.2
T	322	69.0
	$2.8 \times 10^3$	31.0
G	$1 \times 10^3$	32.6
	$5.5 \times 10^3$	67.4
C	219	81.0
	$1.8 \times 10^3$	19.0

(水:メタノール = 1:1)  
 77K  
 0.1N-HCl 添加

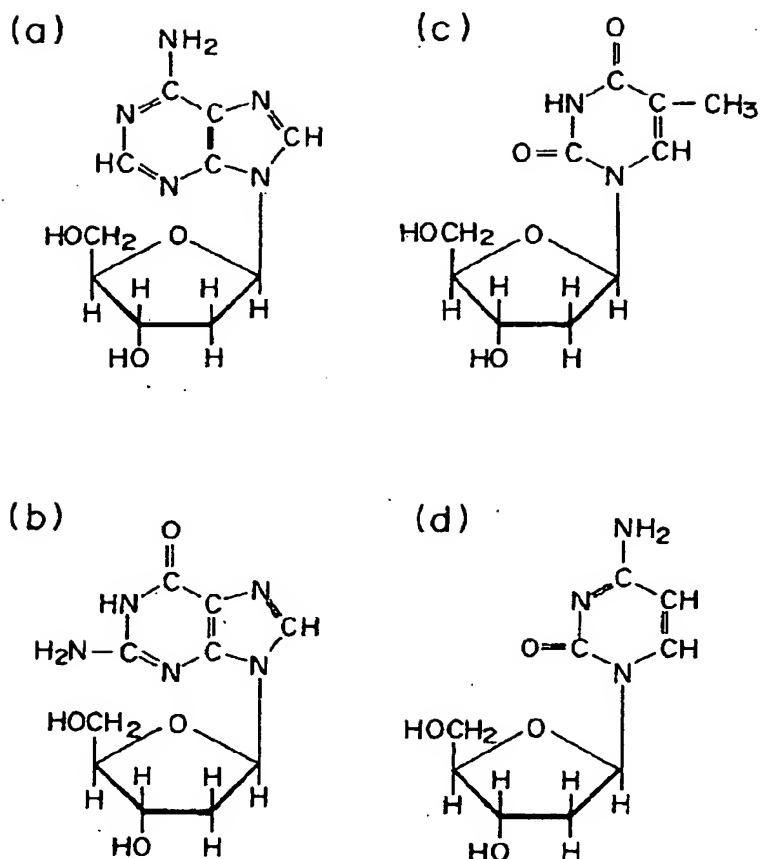
【図5】

温 度 (K)	$\exp(-\Delta E/RT)$	$k\exp(-\Delta E/RT)$ (sec <sup>-1</sup> )
298	$7.2 \times 10^{-4}$	$7.2 \times 10^{19}$
218	$4.9 \times 10^{-5}$	$4.9 \times 10^9$
150	$5.7 \times 10^{-7}$	$5.7 \times 10^7$
120	$1.6 \times 10^{-8}$	$1.6 \times 10^6$
100	$4.3 \times 10^{-10}$	$4.3 \times 10^4$
77	$6.8 \times 10^{-13}$	68

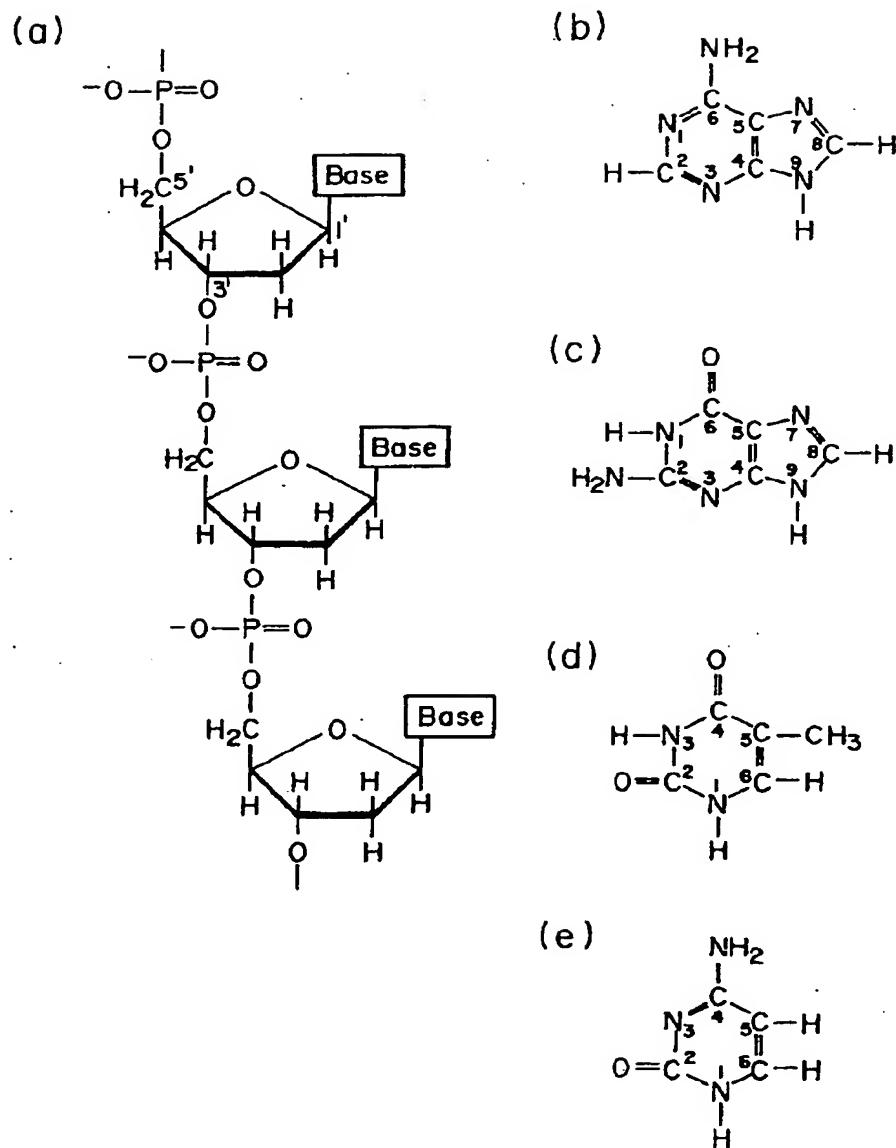
【図6】



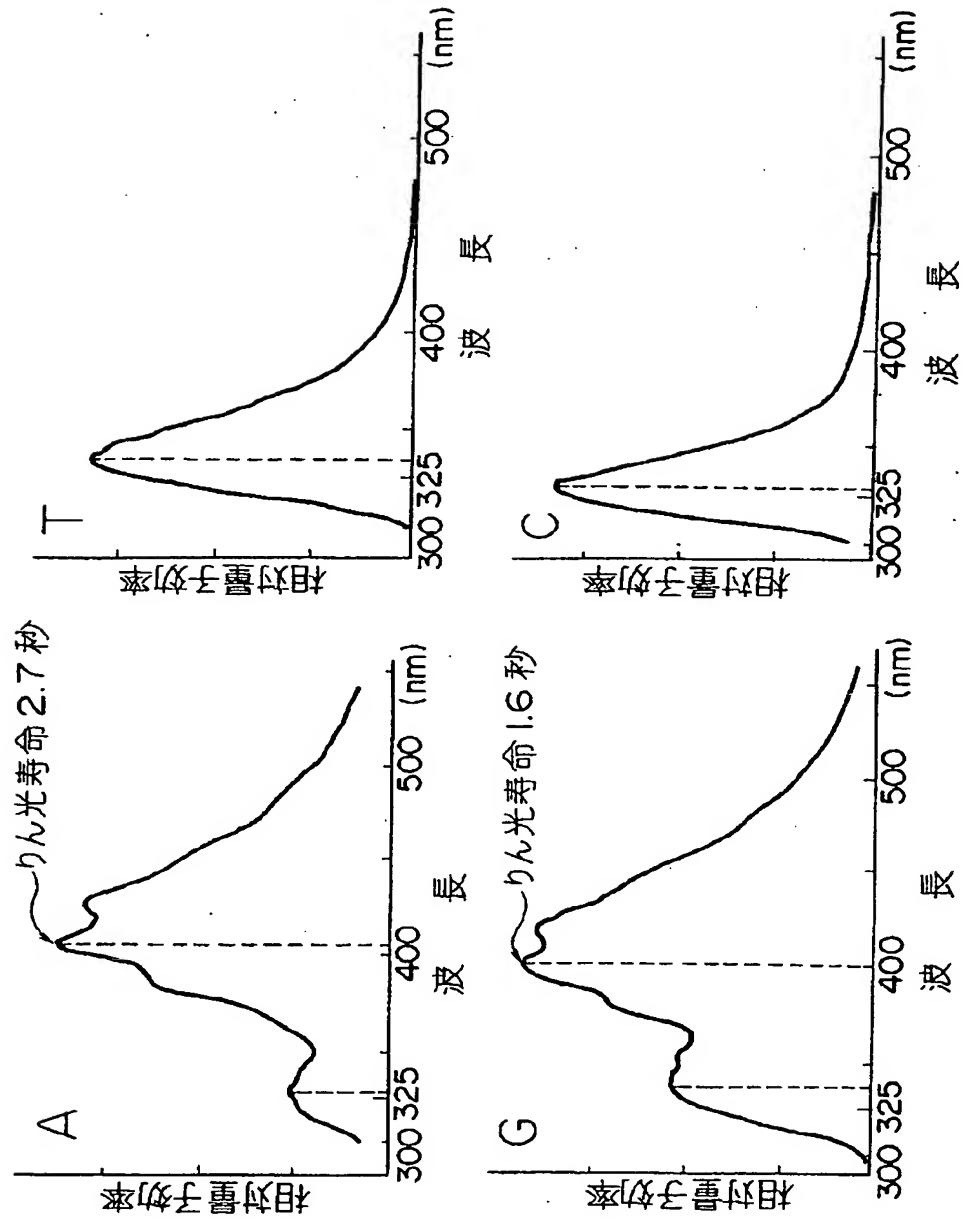
[図7]



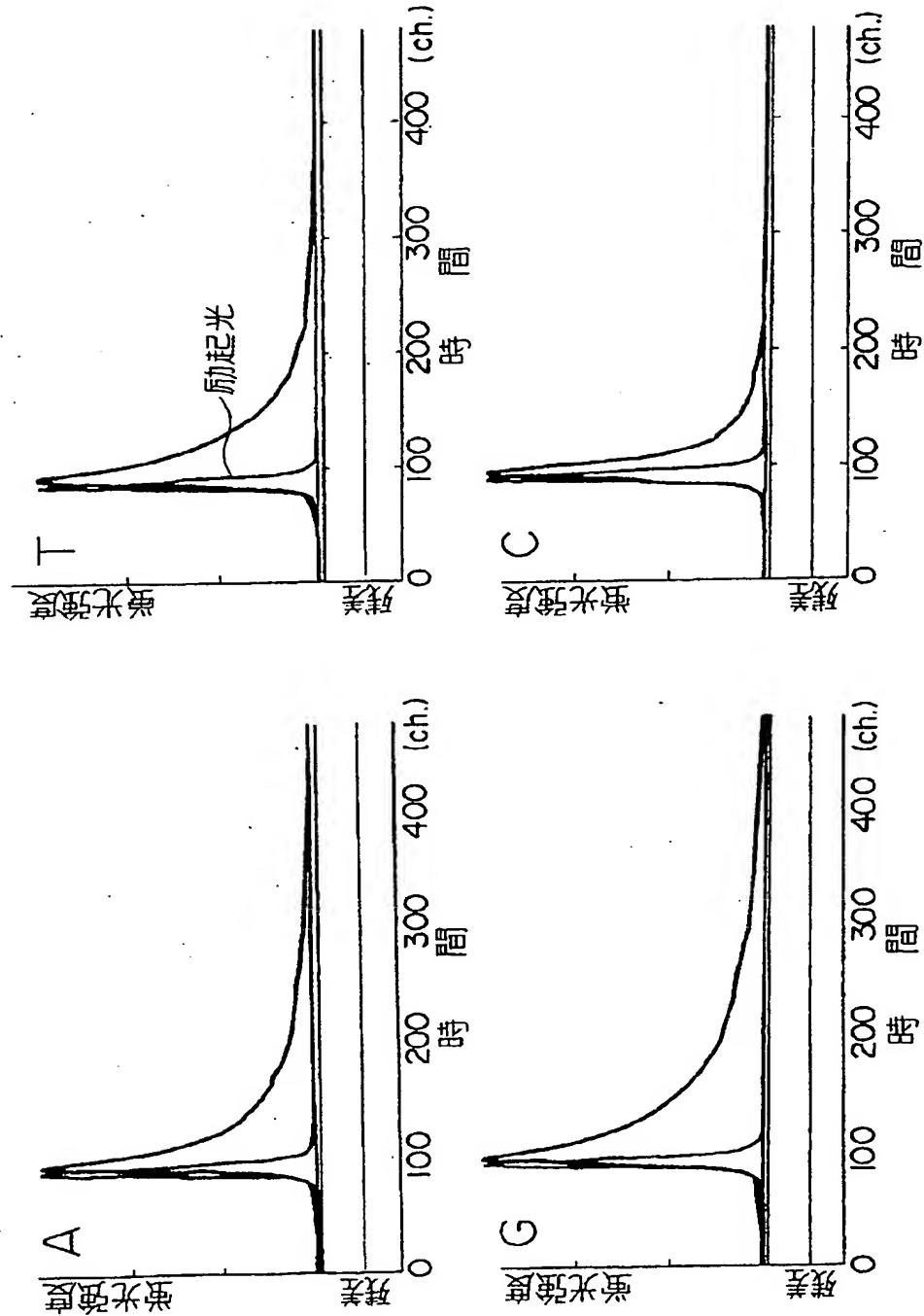
【図8】



【図9】



【図10】



【図11】

	蛍光寿命 (ps)	成分比 (%)
A	500	67.5
	$3 \times 10^3$	26.8
T	490	47.6
	$2.8 \times 10^3$	50.1
G	228	62.0
	$2.4 \times 10^3$	24.7
	$8.4 \times 10^3$	13.3
C	365	77.6
	$1.9 \times 10^3$	21.1

(水:メタノール = 1:1)  
 (77K)

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-126739  
 (43)Date of publication of application : 21.05.1993

(51)Int.CI.

G01N 21/64

(21)Application number : 03-286290

(71)Applicant : HAMAMATSU PHOTONICS KK

(22)Date of filing : 31.10.1991

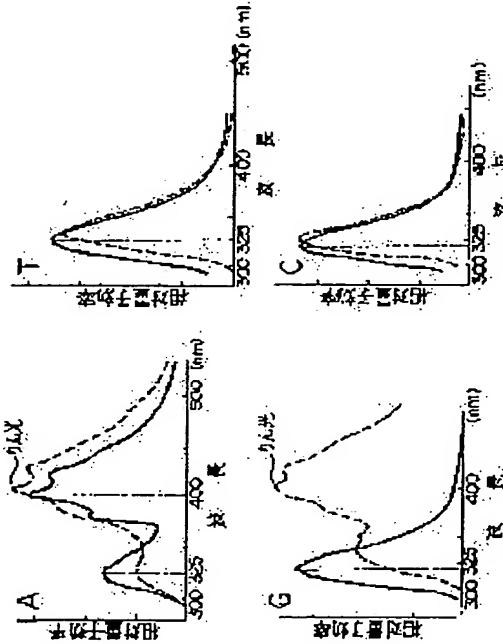
(72)Inventor : ISHIKAWA MITSURU

## (54) DISCRIMINATION METHOD FOR NUCLEIC ACID BASE

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To enable ultrahigh speed discrimination by adding a fluorescence strengthening agent to a sample solution cooled in low temperature and discriminating the nucleic acid bases in a DNA with using fluorescence life observed in the solution.

**CONSTITUTION:** DNA bases are thrown in a solution mixture of water and ethanol with the fraction of 1 to 1 and its temperature is lowered to 77K. In this solution, a fluorescence strengthening agent that is ( $n, \pi^*$ ) quencher, 0.1N hydrochloric acid for example, is added and ultraviolet light is cast. The addition of the 0.1N hydrochloric acid in this process suppresses phosphorescence and strengthens fluorescence peak value in the spectrum for all the nucleic acid bases (broken line shows before the addition of the fluorescence strengthening agent and solid line, after). That is, the addition of the fluorescence strengthening agent distinguishes the difference in both fluorescence lives. Therefore, by comparing the fluorescence lives observed based on the difference, nucleic acid bases A, T, G, C are discriminated with an ultrahigh speed.



### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 26.10.1995

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2821050

[Date of registration] 28.08.1998

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

[decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office